

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Otpornost na antibiotike u bakterije *Acinetobacter baumannii*
(Multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*)

SEMINARSKI RAD

Karla Ivanković
Preddiplomski studij biologije
(Undergraduate university study of Biology)
Mentor: doc. dr. sc. Tomislav Ivanković

Zagreb, 2018.

SADRŽAJ

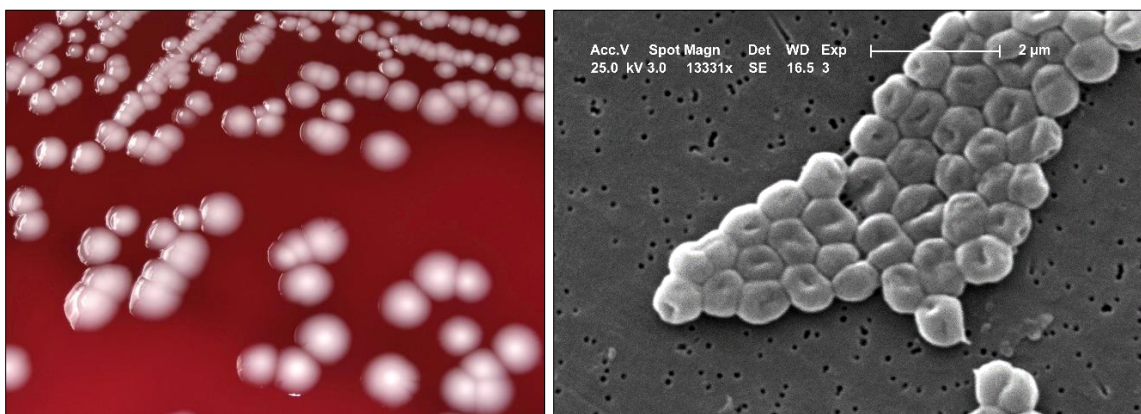
1. UVOD.....	2
2. Bakterija <i>Acinetobacter baumannii</i>	3
3. MEHANIZMI OTPORNOSTI NA GLAVNE SKUPINE ANTIBIOTIKA	4
3.1. OTPORNOST NA β-LAKTAME	4
3.2. OTPORNOST NA AMINOGLIKOZIDE	7
3.3. OTPORNOST NA POLIMIKSINE	8
3.4. OTPORNOST NA KINOLONE	10
3.5. OTPORNOST NA RIFAMPICIN	10
3.6. OTPORNOST NA CIKLINE	11
4. SUSTAV ZA EFLUKS KAO REZISTENCIJSKI MEHANIZAM	11
4.1. RND SUSTAV	11
4.1.1. AbeABC	13
4.1.2. AbeIJK	14
4.1.3. AbeFGH	14
4.2. OSTALI EFLUKS SUSTAVI	15
5. GENETIČKE STRUKTURE POVEZANE SA STJECANJEM I ŠIRENJEM ANTIBIOTSKE REZISTENCIJE.....	16
5.1. INSERCIJSKE SEKVENCE I TRANSPOZONI	16
5.2. INTEGRONI	17
5.3. OTOCI REZISTENCIJE	18
6. ZAKLJUČAK	20
7. LITERATURA	21
8. SAŽETAK	25
9. SUMMARY	25

1. UVOD

Bakterija *Acinetobacter baumannii* je gram-negativni kokobacil koji je posljednjih godina uzrok čestih epidemija u bolnicama u cijelome svijetu, zahvaljujući izrazito brzom stjecanju rezistencije na niz antibiotika. Rezistencija na antibiotike je prirodni evolucijski fenomen adaptacije koji je potenciran pogrešnim iskorištavanjem antibiotika. Biokemijski mehanizmi rezistencije obuhvaćaju mutiranje i modifikaciju ciljnih molekula antibiotika, enzimsku inhibiciju i razgradnju, smanjenu ekspresiju membranskih porina i prekomjernu ekspresiju sustava za efluks. Različite mehanizme bakterija može steći horizontalnim prijenosom plazmida, integra i transpozona od drugih bakterija konjugacijom, transformacijom ili transdukcijom. Višestruka antibiotska rezistencija (*multidrug-resistance*; MDR) bakterije *A. baumannii* definira se kao otpornost na tri ili više reprezentativnih antibiotika sljedećih klasa: β -laktami, aminoglikozidi, polimiksini, kinoloni, ciklini i rifampicin. MDR obuhvaća niz mehanizama, koji se pojedinačno mogu razlučiti na razini genoma. Mehanizmi antimikrobne otpornosti bakterije *A. baumannii* određeni su ili prirodno prisutnim genima na nukleoidu ili genima ugrađenima u integrale, transpozone ili plazmide, te uključuju sve navedene strategije za toleranciju antibiotika. Sojevi bakterije *A. baumannii* pokazuju velike međusobne razlike genetske strukture, što je rezultat izrazite genetičke plastičnosti ove bakterije (Poirel i sur., 2011). Genetske promjene nastaju lateralnim prijenosom gena, amplifikacijom gena i mutacijama gena i promotora. Mutacije gena i promotora mogu posljedično biti dobitak funkcije (*gain of function*) ili gubitak funkcije (*loss of function*), ili pojačanje funkcije. U genomu bakterije *A. baumannii* prisutni su brojni mobilni genetički elementi koji omogućuju rearanžman DNA, inaktivaciju gena insercijom i vrlo rapidno stjecanje i rasprostiranje gena za rezistenciju. Višestruka antibiotska rezistencija kod bakterije *A. baumannii* rezultat je navedenih genetičkih značajki i selektivnih pritisaka.

2. Bakterija *Acinetobacter baumannii*

Bakterija *A. baumannii* pripada rodu *Acinetobacter*, u koji se ubrajaju aerobni gram-negativni, nefermentativni kokobacili, katalaza-pozitivni i oksidaza-negativni. Ova bakterija je slobodno živići saprofit, koji je prisutan u tlu i vodi. Relativno se lako kultivira na krvnom agaru ili MacConkey agaru pri 37°C. Kolonije *A. calcoaceticus* – *A. baumannii* kompleksa su glatke površine, sluzave i svijetlosive boje. Ne pokazuje sposobnost hemolize pri dodatku krvi u hranjivu podlogu. U rutinskom kliničkom radu, bakterija *A. baumannii* se identificira pomoću niza fenotipskih testova. Negativna reakcija na Kligerovu agaru potvrđuje nemogućnost fermentacije. Nadalje, negativna reakcija oksidaze i pozitivna reakcije katalaze, zatim oksidativna razgradnja glukoze i nemogućnost redukcije nitrata upućuju na bakteriju *A. baumannii*. Koriste se i komercijalno dostupni identifikacijski kitovi. Vjerodostojnija identifikacija može se napraviti DNA-DNA hibridizacijskom metodom ili sekvenciranjem genoma bakterije.



Slika 1. (Preuzeto sa web stranice www.cdc.gov) Lijevo je prikazan rast kolonija *Acinetobacter baumannii* na SBA (*sheep blood agar*) mediju nakon inkubacije 48h na 37°C, snimljen digitalnim Keyence mikroskopom pod povećanjem 10x. Desno je prikazan agregat bakterija *A. baumannii* slikan skenirajućim elektronskim mikroskopom.

Bakterija *A. baumannii* (Slika 1.) ne posjeduje bičeve, stoga se smatra nepokretnom. Međutim, primijećena je trzajuća i klizajuća pokretljivost. Polisaharidna kapsula, fimbriji i pili

omogućuju adheziju na površinu biomaterijala, primjerice sluznice, gdje može stvarati biofilm. Biofilm osigurava zaštitu od obrambenih mehanizama domaćina i onemogućuje fagocitozu. Lipopolisaharidi bakterije induciraju proinflamatorne citokine, te nastaje upala. Bakterija *A. baumannii* sintetizira siderofor acinetobaktin, što joj omogućuje preživljavanje na niskim koncentracijama željeza. Radi se oportunističkom patogenu, koji uzrokuje respiratorne i urinarne infekcije, postoperativne sepse i meningitise. Većinom se radi o infekciji u bolničkom okruženju, često u jedinicama intenzivnog liječenja. U bolnicama preživljava na vlažnim površinama poput opreme za respiratornu potporu ili intravaskularnog katetera, i na suhim površinama poput čestica prašine i ljudske kože (Kalenić, 2013).

Ovisno o mehanizmu koji uvjetuje otpornost, određuje se farmakodinamični efekt antibiotika. To je fenotip koji je moguće procijeniti i izražava se kao minimalna inhibirajuća koncentracija (MIC), te se interpretira prema određenim uputama kao osjetljivo, srednje ili otporno (Andrews, 2001). Mnogi pripadnici roda *Acinetobacter* pokazuju rezistenciju na β -laktame širokog spektra, kinolone i aminoglikozide, no bakterija *A. baumannii* je najproblematičniji uzročnik bolničkih infekcija s izrazito visokim MIC vrijednostima za sve klinički korištene razrede antibiotika. Osim što posjeduje intrinzičnu rezistenciju na velik broj antibiotika, bakterija *A. baumannii* ima sposobnost rapidnog stjecanja novih rezistencijskih mehanizama, zbog čega postotak multirezistentnih sojeva vrtoglavo raste.

3. MEHANIZMI OTPORNOSTI NA GLAVNE SKUPINE ANTIBIOTIKA

3.1. OTPORNOST NA β -LAKTAME

β -laktami su razred antibiotika specifične strukture, za koju je karakterističan četveročlani ciklični amid, β -laktamski prsten, ključan za mehanizam djelovanja ovih antibiotika. U β -laktame se ubrajaju derivati penicilina, cefemi (cefalosporini i cefamicini), monobaktami i karbapenemi. Neke od dostupnih antibiotika prirodno sintetiziraju određeni mikroorganizmi. Primjerice, penicilin sintetizira *Penicillium notatum*, dok rod *Acremonium* sintetizira cefalosporine. Većina β -

laktama djeluje na način da inhibira biosintezu stanične stijenke na razini esencijalnih enzima biosinteze peptidoglikana (Kong i sur., 2010). Ciljna mjesta djelovanja β -laktama su transpeptidaza i D-alanin karboksipeptidaza, enzimi usidreni u staničnu membranu, koji sudjeluju u posljednjoj fazi biosinteze peptidoglikana i vrše pravilno povezivanje peptidoglikanskih lanaca (Zeng i sur., 2013). Ovi enzimi poznati su kao penicilin-vezujući proteini (*penicillin-binding proteins*; PBP), zbog sposobnosti kovalentnog vezanja β -laktama. Jednom kada se β -laktam veže na PBP, funkcija enzima je narušena. Krajnji rezultat je smrt bakterije zbog osmotske nestabilnosti ili autolize. Budući da djeluju bakteriostatski, β -laktami se primjenjuju u logaritamskoj fazi rasta bakterija.

Rezistencija na beta-laktame kod *A. baumannii* temelji se na mehanizmima inhibirajućih enzima, redukcije ekspresije porina, čime se smanjuje propusnost vanjske membrane, povećana ekspresija određenih membranskih pumpi, čime se povećava učinkovitost izbacivanja antibiotika iz stanice, te, u manjoj mjeri, modifikacija penicilin-vezujućih proteina. β -laktamaze kataliziraju hidrolizu β -laktamskog prstena i visoko su učinkoviti enzimi. PBP i β -laktamaze su srodni proteini. Ambler i sur. (1980) klasificirali su β -laktamaze u četiri razreda, β -laktamaze A, B, C i D. Razredi A, C i D vrše katalizu pomoću ključnog serinskog ostatka, a razred B pomoću katalitičkog cinka. β -laktamaze razreda A, tzv. penicilinaze, pokazuju najveću varijabilnost sekvenci. Geni za penicilinaze pronađeni su na bakterijskom kromosomu, plazmidima i unutar transpozona. Razred B obuhvaća metalo- β -laktamaze. Pronađeni su geni *bla_{VIM}*, koji je zaslužan za rezistenciju na imipenem i meropenem, i *bla_{IMP}*. Razred C β -laktamaze su, većini Gram-negativnih bakterija intrinzične, cefalosporinaze. Najpoznatiji gen je *ampC*. Razred D obuhvaća oksicilinaze, β -laktamaze koje hidroliziraju β -laktame poput oksacilina i metecilina. Inhibitori β -laktamaze su klavulanska kiselina, sulbaktam i tazobaktam.

Intrinzične β -laktamaze mogu biti eksprimirane konstitutivno ili njihova ekspresija može biti inducirana prisutnošću β -laktama. Budući da β -laktami ne prodiru u citoplazmu, već djeluju u periplazmatskom prostoru, mora postojati mehanizam komunikacije. Predloženi molekularni model indukcije β -laktamaza podrazumijeva slijedeće: kako tijekom rasta stanice hidrolizirajući enzimi razgrađuju peptidoglikanske polimere, kraći se lanci muropeptida prenose u stanicu pomoću permeaze AmpG, gdje ih cijepa AmpD N-acetilmuramil peptidaza, čime se omogućuje recikliranje mureina. Bakterija *A. baumannii* posjeduje intrinzične gene za beta-laktamaze, *ampC*

i *bla_{OXA-51}*. AmpC cefalosporinaza pridonosi rezistenciji na ceftazidim. OXA-51 β -laktamaza, za koju su opisane mnoge varijante s točkastim mutacijama, je oksacilinaza s karbapenemaznom aktivnošću, no vrlo je slabo eksprimirana i slabo doprinosi rezistenciji na karbapeneme (Fang i sur., 2016). Tijekom normalnog rasta, AmpR je vezan za promotor *ampC* gena i reprimira njegovu ekspresiju. Međutim, u prisutnosti β -laktama dolazi do akumulacije muramilpeptida u periplazmatskom prostoru i citoplazmi, što je okidač disocijacije AmpR s promotora, čime je omogućena ekspresija AmpC β -laktamaze. Bazalna ekspresija u stanici ne doprinosi rezistenciji. Međutim, insercijska sekvenca koja sadrži jaki promotor, poput *ISAbal* i *ISAbal25*, može potencirati ekspresiju ovih gena ako se nalazi na njihovom 5' kraju.

Osim intrinzičnih, u bakteriji *A. baumannii* su identificirani nekoliko stečenih β -laktamaza koji su temelj rezistencije na karbapeneme. Radi se o oksacilnazama ili metalo- β -laktamazama (MBL). Oksacilinaze koje hidroliziraju imipenem su grupirane u podgrupu β -laktamaza, karbapenem-hidrolizirajuće oksacilinaze (CHDL). U bakteriji *A. baumannii* su identificirana tri tipa MBL enzima, kodiranih genima *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* i *bla_{SIM}* smještenim unutar integrona razreda 1. U *A. baumannii* su pronađene četiri podgrupe stečenih CHDL enzima, s reprezentativnim enzimima kodiranim *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-24}*, *bla_{OXA-51}* i *bla_{OXA-58}*. CHDL su najzastupljenije karbapenemaze u *A. baumannii* (Poirel i sur., 2006). Radi se o relativno slabim hidrolazama, no otpornost se razvija prekomjernom ekspresijom *bla_{OXA}* gena. Geni *bla_{OXA-23}* i *bla_{OXA-58}* su većinom pronađeni na plazmidima, dok za *bla_{OXA-24}* nije pronađen u okruženju mobilnih genetičkih elemenata. Nadalje, pronađene su stečene β -laktamaze uskog spektra – penicilinaze uskog spektra TEM-1, TEM-2 i CARB-5 i oksacilinaze OXA-20 i OXA-21. Nadalje, pronađene su β -laktamaze širokog spektra (*extended spectrum β -lactamase*; ESBL): PER-1, PER-7 i VEB-1. ESBL geni često su asocirani s genima za rezistenciju na aminoglikozide.

Primijećeno je da rezistentnim sojevima *A. baumannii* nedostaju proteini vanjske membrane (*outer membrane proteins*; OMP). Daljnja istraživanja potvrdila su da gubitak ovih proteina doprinosi otpornosti na određene antibiotike. Primjer OMP je CarO, protein veličine 29 kDa, prisutan u jednoj kopiji u genomu bakterije *A. baumannii*. Odsutnost CarO u različitim karbapenem-rezistentnim kliničkim izolatima *A. baumannii* posljedica je transpozicije IS elementa usred *carO* gena. CarO je porin, protein koji oblikuje kanal i omogućava pasivnu difuziju antibiotika kroz vanjsku membranu. Porini uobičajeni za Gram-negativne bakterije imaju visoki

udio glicina, negativan naboj, ne sadrže cisteine ni aminokiseline velikih hidrofobnih ogranka. Gubitak proteina s navedenim karakteristikama smanjuje permeabilnost vanjske membrane i time onemogućuje prodor antibiotika, u ovom slučaju β -laktama, u periplazmatski prostor. Tri porina OmpA obitelji povezana su s redukcijom osjetljivosti na karbapeneme. Također, u održavanju rezistencije sudjeluje i membranski aktivni transport, efluks sustav AdeABC. Prekomjerna ekspresija ovog sustava doprinosi rezistenciji izbacivanjem molekula β -laktama iz periplazmatskog prostora. Modifikacije penicilin-vezujućih proteina, ciljnih molekula β -laktama, rijetko su uočene u *A. baumannii* i drugih Gram-negativnih bakterija (Williamson i sur., 1986).

3.2. OTPORNOST NA AMINOGLIKOZIDE

Aminoglikozidi su prvi puta prepoznati prije 75 godina, kada je otkriven streptomycin, kada su prepoznati kao baktericidi širokog spektra – djeluju na većinu klinički izoliranih patogena i oportunističkih patogena. Većinu aminoglikozida prirodno sintetiziraju određeni mikroorganizmi ili se radi polu-sintetičkim derivatima prirodnih spojeva. Ovi antibiotici napadaju bakteriju u dva koraka – unos antibiotika u stanicu, te vezanje na ribosom. Aminoglikozidi sadrže brojne protonirane skupine, što im daje pozitivan naboj. Zbog toga lako reagiraju s negativno nabijenom površinom bakterijske stanice, ali i s negativno nabijenom okosnicom nukleinskih kiselina. Aminoglikozidi imaju visok afinitet za akceptorsko mjesto bakterijskog ribosoma (mjesto na koje se veže aminoacil-tRNA). Vezanjem se narušava tijek translacije, te posljedično nastaju skraćeni peptidi, koji ugrožavaju bakteriju. Primjenjuju se u stacionarnoj fazi rasta bakterija, te se koriste u kombinaciji s beta-laktamima za tretiranje infekcija uzrokovanih bakterijom *A. baumannii*, budući imaju sinergistički učinak.

Glavni mehanizam rezistencije na aminoglikozide kod Gram-negativnih bakterija je enzimatska modifikacija amino i hidroksilnih skupina aminoglikozida, čime se reducira ili potpuno onemogućuje njegovo vezanje na ribosom. Kod bakterije *A. baumannii*, ovakav mehanizam temeljen je na aktivnosti acetiltransferaza (AAC), nukleotidil transferaza (ANT) i fosfotransferaza (APH). U bakteriji *A. baumannii* postoje geni *aac(3)-I*, *aac(3)-II*, i *aac(6')-Ib* koji kodiraju AAC, enzime koji kataliziraju acetilaciju slobodnih hidroksilnih skupina. Nadalje, prisutan je gen *aph(3')-I* za fosfotransferazu, enzim koji katalizira prijenos fosfatne skupine na slobodne

hidroksilne skupine. Geni *ant(3'')-I* i *ant(2'')-I* kodiraju adenzin transferaze, enzime koji kataliziraju adenilaciju slobodnih hidroksilnih skupina. 16S rRNA metilaze ArmA, RmtA, RmtB, RmtC i RmtD prisutne su među pripadnicima roda *Acinetobacter* (Doi i Arakawa, 2007). Ovi enzimi modificiraju 16S rRNA 30S podjedinice ribosoma, što onemogućuje vezanje aminoglikozida i inhibira aktivnost ovog antibiotika. Gen *armA* prisutan je u genomu bakterije *A. baumannii* (Cho i sur., 2009). Geni za aminoglikozid-modificirajuće enzime i 16S rRNA metilaze asocirani su s mobilnim genetičkim elementima, čime je omogućen horizontalni prijenos.

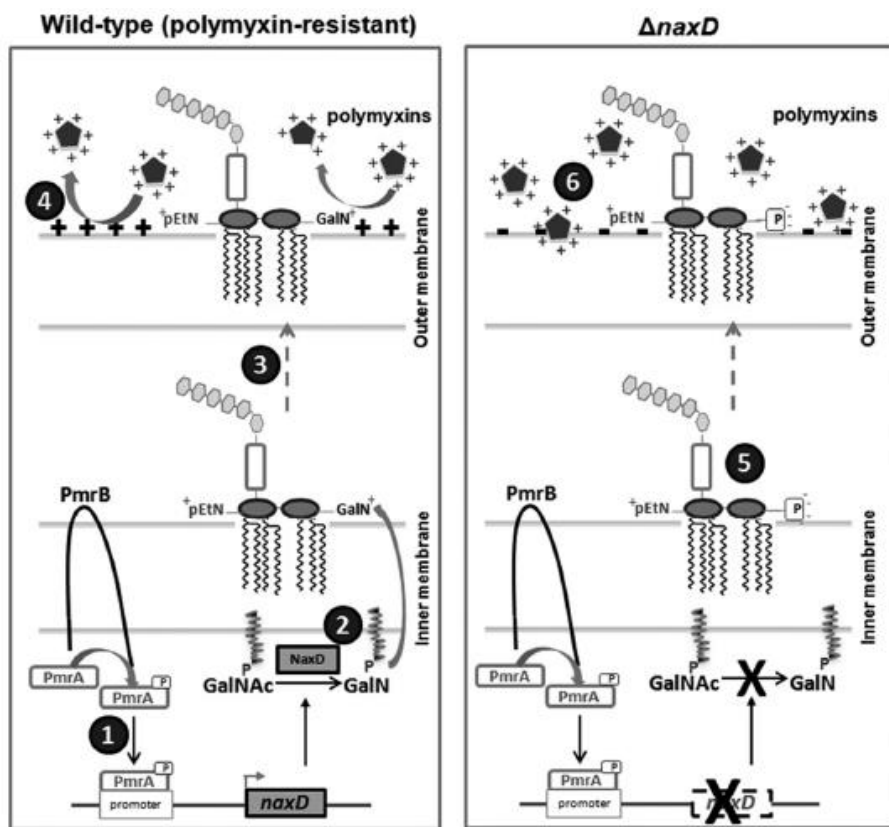
3.3. OTPORNOST NA POLIMIKSINE

Polimiksini djeluju na način da narušavaju negativan naboj s vanjske strane membrane Gram-negativnih bakterija. Polimiksin B i kolistin (polimiksin E) koriste se kao posljednji pokušaj tretiranja visoko rezistentnih Gram-negativnih bakterijskih patogena. Radi se o pozitivno nabijenim peptidima koji elektrostatski vežu negativno nabijen lipid A, sastavnicu lipopolisaharida, što rezultira narušavanjem vanjske i unutarnje membrane (Olaitan i sur., 2014).

Postoji nekoliko mehanizama kojima bakterija *A. baumannii* održava otpornost na ove antibiotike. Jedan način je da postiže redukciju net negativnog naboja proteina s vanjske strane membrane modificiranjem lipida A, esencijalne komponente bakterijskog lipopolisaharida. Ovaj mehanizam se temelji na dvije genetičke promjene: mora se dogoditi nesinonimna mutacija u genu *pmrB* i mora doći do pojačane ekspresije *pmrA* ili *pmrB* gena. Ovi geni kodiraju PmrAB kompleks. Jedna od zapaženih mutacije je duplikacija 30 nukleotida duge sekvence unutar *pmrB* (Jaidane i sur., 2017). PmrAB je senzor pH i ionske koncentracije u okolišu. Rezistencija se temelji na modifikaciji ciljne molekule antibiotika – lipida A. Radi se o modifikaciji visoko negativnih fosfatnih skupina lipida A s pozitivno nabijenim molekulama, galaktozaminom ili fosfoetanolaminom. Pozitivniji naboj odbija pozitivno nabijene polimiksine. U *Acinetobacter* spp. otpornost je kontrolirana PmrA/PmrB dvokomponentnim regulatornim sustavom, koji regulira modifikaciju lipopolisaharidnog omotača. PmrB je membranska senzorna kinaza, aktivirana autofosforilacijom histidinskog ostatka, koja, kao odgovor na vanjski pH i koncentraciju željeza, aktivira transkripcijski regulator PmrA prijenosom fosfatne skupine. U svojem radu, Chin i sur. (2015) identificirali su NaxD deacetilazu ključni enzim u modifikaciji lipida A, te su pokazali da

je gen *naxD* reguliran transkripcijskim faktorom PmrA. NaxD katalizira deacetilaciju acetil-glukozaminske skupine. Produkt reakcije, glukozaminska skupina, zatim se veže na fosfatnu skupinu lipida A, što posljedično snižava negativni naboj vanjske membrane (Slika 2.). Točkaste mutacije u genu *pmrB*, često unutar kinazne domene) utječu na povišenje MIC polimiksina. Aktivacijske mutacije u PmrB vode prekomjernoj ekspresiji gena *naxD*.

Drugi mehanizam uključuje mutacije u genima *lpxA*, *lpxC* i *lpxD*, čiji produkti sudjeluju u biosintezi lipida A. Pronađene su i insercijske sekvence IS*Aba11* u nekim od ovih gena. Ove mutacije onemogućuju sintezu lipida A i, konačno, lipopolisaharida, što bakteriji *A. baumannii* pruža visoki stupanj rezistencije na kolistin (Cai i sur., 2012). Bakterija *A. baumannii* se, naime, može nositi s gubitkom LPS na način da prilagodi biosintezu sustava povezanih s modulacijom strukture bakterijske površine. Bakterija *A. baumannii* koristi i treći mehanizam – proteolitičko cijepanje antibiotika i izbacivanje produkata iz stanice pomoću membranskih pumpi širokog spektra.



Slika 2. (Preuzeto iz Chin i sur., 2015) Model koji opisuje ulogu NaxD u polimiksinskoj rezistenciji. Lijevo je prikazana shema za polimiksin-rezistentni divlji tip *A. baumannii*, a desno za *naxD* mutanta. Brojevi 1-6 pokazuju korake regulacijske kaskade. (1) PmrB fosforilira PmrA kao odgovor na okolišni podražaj. Aktivirani PmrA veže promotor gena *naxD* i inducira transkripciju. (2) NaxD deacetilira N-acetilgalaktozaminsku skupinu lipidnog nosača, koji se posljedično prenosi na vanjsku stranu unutarnje membrane. (3) Dolazi do stvaranja lipopolisaharida koji sadrži lipid A, koji se transportira na vanjsku stranu vanjske membrane. (4) N-acetilgalaktozaminska skupina je pozitivno nabijena, što utječe na povišenje lokalnog naboja membrane i odbija pozitivno nabijene molekule polimiksina. (5) U *naxD* mutantu, lipid A nedostaje N-acetilgalaktozaminsku skupinu, zbog čega (6) vanjska membrana nije pozitivnije nabijena, te polimiksin može djelovati.

3.4. OTPORNOST NA KINOLONE

Kinoloni i fluorokinoloni djeluju tako da vežu bakterijsku girazu i topoisomerasu IV. U *A. baumannii* su česte mutacije ciljnog mjesta kinolona i fluorokinolona. Primjerice, Ser-83-Leu supstitucija u GyrA u kombinaciji sa supstitucijama Ser-80-Leu ili Ser-80-Tyr, te Glu-84-Lys u ParC, su mutacije koje bakterija *A. baumannii* u kombinaciji osiguravaju visoku rezistenciju na kinolone (Liu i sur., 2012). Osjetljivost na kinolon dodatno smanjuju pet membranskih pumpi: AdeABC, AdeIJK, AdeFGH, AbeS i AbeM. Nisu poznati plazmidom kodirani mehanizmi rezistencije na kinolone u *A. baumannii*.

3.5. OTPORNOST NA RIFAMPICIN

Rifampicin specifično inhibira bakterijsku RNA polimerazu stvarajući izrazito stabilni kompleks s enzimom. Kompleks je stabiliziran hidrofobnim učinkom i vodikovim vezama ostvarenim između molekule antibiotika i aminokiselina u aktivnom mjestu RNA polimeraze. Rezistencija na rifampicin u *A. baumannii* posljedica je mutacija koje uzrokuju promjene u β podjedinici RNA polimeraze, točnije, mijenjaju jednu od konzerviranih aminokiselina u aktivnom mjestu. Osim mutacija, rezistenciji doprinosi enzim rifampicin ADP-ribosilirajuća transferaza, kodiran genom *arr-2*. Ovaj enzim katalizira prijenos ribozilne skupine na rifampicin, čime je onemogućeno vezanje antibiotika na RNA polimerazu.

3.6. OTPORNOST NA CIKLINE

Tetraciklini su razred antibiotika otkriven 1940. godine. Strukturu tetraciklina čini linearna spojena tetraciklična jezgra (A, B, C i D prsteni) na koju su vezane različite funkcionalne skupine. Mehanizam djelovanja tetraciklina uključuje inhibiciju sinteze proteina vezanjem na vezno mjesto aminoacil-tRNA na ribosomalnom akceptorskom (A) mjestu. U kompleksu s magnezijevim ionom, tetraciklini mogu proći vanjsku membranu Gram-negativnih bakterija pomoću porina OmpF i OmpC. U periplazmatskom prostoru vjerojatno dolazi do disocijacije magnezija i tetraciklina, te tetraciklin, kao slabo lipofilna molekula difundira u stanicu. Ciklini reverzibilno vežu 30S ribosomsku podjedinicu, što inhibira translaciju. Bakteriji *A. baumannii* rezistenciju na tetracikline omogućuju TetA i TetB membranske crpke, koje izbacuju tetracikline iz stanice. Regulacija ekspresije ovih efluks sustava detaljnije je opisana kasnije u tekstu. Nadalje, postoje proteini, homologni EF-Tu i EF-G elongacijskim faktorima, koji sudjeluju u zaštiti ribosoma od vezanja tetraciklina. Primjer ovakvih proteina je TetM, koji kompetira EF-G faktoru za vezno mjesto na ribosomu. Čini se da TetM potpomaže disocijaciju tetraciklina s ribosoma koristeći energiju hidrolize GTP-a. Regulacija ekspresije *tetM* određena je DNA regijom uzvodno od gena i pokazano je da ovisi o prisutnosti tetraciklina u stanici.

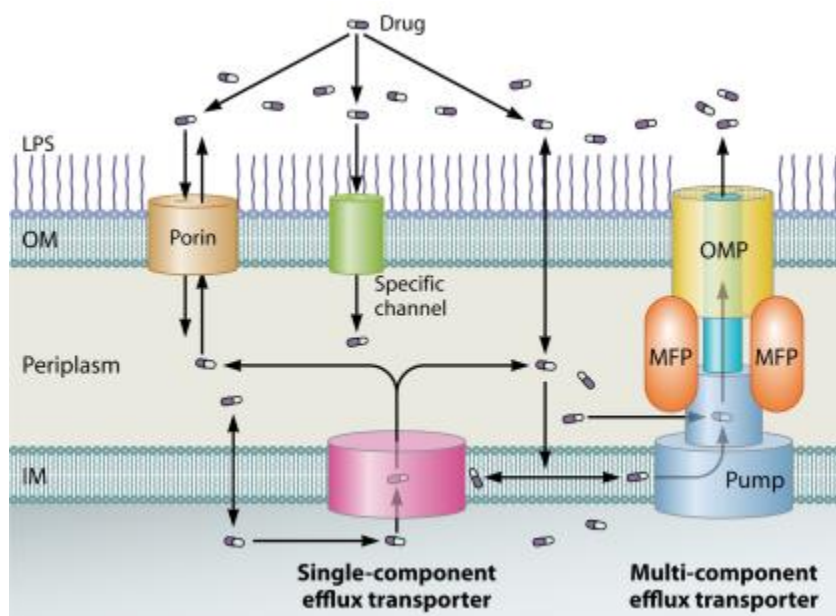
4. SUSTAV ZA EFLUKS KAO REZISTENCIJSKI MEHANIZAM

4.1. RND SUSTAV

Rezistencijski mehanizmi izbacivanja molekula antibiotika iz stanice aktivnim membranskim transportom prisutni su u mnogim bakterijskim rodovima. Pojačana ekspresija sustava aktivnih transportera onemogućuje akumulaciju antibiotika, što je vrlo efikasan mehanizam rezistencije. Geni koji kodiraju ove mehanizme nalaze se na mobilnim genetičkim elementima ili su kodirani bakterijskim kromosomom. Radi se o pet superobitelji sustava za transport – ABC (*ATP-binding cassette*), SMR (*small multidrug resistance*), MATE (*multidrug*

and toxic compound extrusion), MFS (*major facilitator superfamily*) i RND (*resistance-nodulation-cell division family*).

Transporteri za tetraciklin su jednokomponentni sustav i primjer su specifičnog sustava, čiji supstrat čini mali broj antibiotika. S druge strane, višekomponentni sustavi, poput RND sustava, manje su specifični i efikasni su za veći niz supstrata različitih struktura. RND sustav sastoji se od RND pumpe, proteina na unutarnjoj membrani, OMF (*outer membrane factor*), proteina na vanjskoj membrani i MFP (*major fusion protein*), koji povezuje RND pumpu i OMF. RND sustav od velike je važnosti jer omogućuje prijenos preko obje, unutarnje i vanjske, membrane (Slika 3.). Ovisno o soju, kromosom *A. baumannii* kodira 7 RND, više od 30 MFS i nekoliko MATE, SMR i ABC sustava (Coyne i sur., 2011). Provedeno je istraživanje koje uspoređuje genom soja visoko-osjetljivog na antibiotike s genomima MDR sojeva (Adams) i rezultati pokazuju da su njihovi genomi vrlo slični, što upućuje na to da aktivni transport kroz membranu nije primarna strategija MDR, nego je vjerojatnije da pridonose MDR. Višestrukoj rezistenciji uvelike doprinosi pojačana ekspresija kromosomalnih gena za proteine koji sudjeluju u aktivnom membranskom transportu. Aktivni transport ne ostvaruje visoku otpornost, nego u manjoj mjeri povisuje MIC, što omogućava bakteriji solidnu otpornost u kombinaciji s ostalim mehanizmima.



Slika 3. (Preuzeto iz Li i sur., 2015) Shema membranskog transporta antibiotika. Molekule antibiotika ulaze u periplazmatski prostor pomoću specifičnih kanala (CarO) i manje specifičnih porina (Omp), te dalje difundiraju u stanicu. Izbacivanje antibiotika iz stanice vrše efluks transporteri, koji se mogu sastojati od samo jedne komponente (*single-component efflux transporters*), primjerice Tet crpke, koja izbacuje antibiotik iz stanice u periplazmatski prostor, ili su to kompleksi sa više podjedinica (*multi-component efflux transporters*), primjerice, AbeABC. Tripartitni sustav AbeABC sadrži crpku i kanal vanjske membrane (*outer membrane channel protein*; OMP), koje povezuje fuzijski protein (*membrane fusion protein*; MFP), što mu omogućuje direktno izbacivanje antibiotika u okolni medij. Kompeticija između porina i sustava za efluks, uz razinu hidrofobnosti molekula antibiotika, konačno određuje ravnotežno stanje antibiotika u stanici. (LPS – lipopolisaharid, OM – vanjska membrana, IM – unutarnja membrana)

4.1.1. AbeABC

Važni mehanizam višestruke rezistencije je prekomjerna ekspresija AdeABC (*Acinetobacter drug efflux*). Ovaj mehanizam kodiran je operonom *adeABC* sadrži gene za AdeA MFP, AdeB transporter i AdeC OMF (Sugawara i Nikaido, 2014). Operon *adeABC* nije eksprimiran u prirodnim izolatima *A. baumannii*. Međutim, prekomjerno je eksprimiran u MDR sojevima. Naime, ekspresija *adeABC* je regulirana AdeR-AdeS dvokomponentnim regulatornim sustavom. AdeR je transkripcijski aktivator, čija aktivnost je regulirana AdeS senzornom kinazom. AdeS ima fosforilaznu i fosfataznu aktivnost – fosforilacijom aktivira AdeR, defosforilacijom inaktivira AdeR. Ovaj sustav kodiran je *adeRS* operonom, smještenom uzvodno od *adeABC* i prepisuje se u suprotnom smjeru od *adeABC*. Pojačana ekspresija događa se kao posljedica mutacije u *adeRS*. Primjerice, supstitucija prolina leucinom na mjestu 116 polipeptidnog lanca AdeR. Ova supstitucija vjerojatno uzrokuje promjenu u strukturnoj konformaciji AdeR (Marchand i sur., 2004). Nadalje, pojačanu ekspresiju uzrokuje supstitucija treonina metioninom na mjestu 153 polipeptidnog lanca AdeS. Mjesto 153 nalazi se u regiji histidinske kutije (*histidine box*), četiri aminokiseline nizvodno od konzerviranog histidinskog ostatka. Supstitucije na homolognom mjestu u drugim senzornim kinazama inhibiraju fosfataznu aktivnost. Posljedično, AdeR je stalno aktivan i operon *adeABC* konstitutivno eksprimiran. Dodatno, supstitucija glicina aspartatom na mjestu 30 aminokiselinskog slijeda AdeS rezultira prekomjernom ekspresijom *adeABC* operona. Mjesto 30 nalazi se u petlji koja prodire u periplazmatski prostor i potencijalno sudjeluje u prepoznavanju signala koji aktivira čitavi sustav. Supstitucija Gly-Asp potencijalno inhibira osjetljivost AdeS na signalnu molekulu i omogućuje konstantnu aktivnost AdeS. Sinonimni

fenotip daje i supstitucija alanina valinom na mjestu 94 aminokiselinskog slijeda AdeS. Mjesto 94 nalazi se u „*linker*“ domeni, koja je uljučena u prijenos signala između domene prepoznavanja signala i histidinske kutije. Inaktivacijom *adeRS* reducira se razina rezistencije. Poznato je da do pojačane ekspresije AdeABC dovodi transpozicija *ISAbal* u *adeS*, što je postignuto ili narušavanjem gena ili osiguravanjem jakog promotora kojim je reguliran operon *adeABC*. Međutim, poznati su i mutanti s pojačanom ekspresijom *adeABC* koji nemaju mutaciju u *adeRS*. Primjerice, mutacije u promotorskoj regiji *adeABC* operona mogu utjecati na afinitet vezanja AdeR transkripcijskog faktora.

Prekomjerna ekspresija AdeABC je povezana s višestruko rezistentnim fenotipom - inaktivacijskim eksperimentima potvrđena je neosjetljivost na aminoglikozide, beta-laktame, fluorokinolone, tetracikline, makrolide, kloramfenikol i trimetoprim. S obzirom na otpornost na karbapene, hiperekspresija AbeABC pridonosi u maloj mjeri, a uključeni su drugi mehanizmi transporta. Potvrđeno je da, prilikom izlaganja otopini NaCl, bakterija *A. baumannii* pokazuje određenu razinu otpornosti na karbapeneme, aminoglikozide, kinolone i kolistin. Osmotski stres je potencijalni induktor ekspresije sustava za aktivni membranski transport (Coyne i sur., 2011).

4.1.2. *AdeIJK*

Intrinzična AdeIJK pumpa kodirana je *adeIJK* operonom. Regulacija ekspresije operona nije poznata. Supstrat AdeIJK su određeni beta-laktami, fluorokinoni, tetraciklin, tigeciklin, rifampin, kloramfenikol, kotrimoksazol, novobiocin i drugi, dok aminoglikozidi nisu. Međutim, prekomjerna ekspresija AdeIJK je toksična za bakteriju domaćina, zbog čega nije vjerojatno da ovaj mehanizam značajnije doprinosi rezistenciji.

4.1.3. *AdeFGH*

Nadalje, višestrukoj antibiotskoj rezistenciji doprinosi i pojačana ekspresija AdeFGH, sustavu aktivnog transporta kodiranog *adeFGH* operonom. Uzvodno od *adeFGH* nalazi se gen za transkripcijski regulator LysR-tipa, *adeL*, transkribiran u suprotnom smjeru. AdeL veže

intergensku regiju u kojoj se preklapaju nukleotidne sekvence promotora *adeFGH* i *adeL*. AdeFGH u divljem tipu bakterija *A. baumannii* nije konstitutivno eksprimiran i ne doprinosi otpornosti. Povećanu ekspresiju pokazuju mutanti sa supstitucijom threonina lizinom na mjestu 319, u C-terminalnoj domeni AdeL. Mutacije u ovoj domeni uzrokuju neovisnost oligomerizacije AdeL i interagiranje s RNA polimerazom. Nadalje, supstitucije valina glicinom na mjestu 139, u domeni uključenoj u prepoznavanje signala, uzrokuju aktivaciju AdeL neovisnu o signalu.

4.2. OSTALI EFLUKS SUSTAVI

Osim RND, u bakteriji *A. baumannii* su prisutni i CraA, AmvA, AbeM i AbeS sustavi aktivnog membranskog transporta, uključeni u antibiotsku rezistenciju. Supstrat CraA (*chloramphenicol resistance Acinetobacter*) pumpe je jedino kloramfenikol i sudjeluje u intrinzičnoj rezistenciji *A. baumannii*. AmvA izbacuje eritromicin, različite boje i deterdžente, sudjeluje u intrinzičnoj rezistenciji, koja ovisi o prekomjernoj ekspresiji sustava. AbeM kao supstrat veže aminoglikozide, fluorokinolone, kloramfenikol, trimetoprim, etidijev bromid i različite boje, međutim, nema značajan doprinos rezistenciji. AbeS je pronađen u nekim sojevima *A. baumannii*, u manjoj mjeri doprinosi rezistenciji na kloramfenikol, novobiocin, eritrimicin i fluorokinolone.

Bakterija *A.baumannii* sadrži i strane mehanizme aktivnog transporta koji omogućuje izbacivanje antibiotika iz stanice, koji su kodirani genima uklopljenim u mobilne genetičke elemente. Radi se o membranskim pumpama uskog spektra, MFS i SMR sustavima. MFS obitelj uključuje TetA, TetB, CmlA i FloT, a SMR uključuje QacE. TetA i TetB sustavi sastoje se od gena koji kodira proteinsku crpku i gena koji kodira represorski protein. Ovi geni usmjereni su na suprotne strane i njihove promotorske i operatorske regije se preklapaju. U odsutnosti tetraciklina, represor postoji kao homodimer koji veže *tet* operatore i inhibira transkripciju. Tetraciklin-Mg²⁺ kompleks može vezati represor, što mijenja njegovu konformaciju i onemogućuje daljnju represiju.

5. GENETIČKE STRUKTURE POVEZANE SA STJECANJEM I ŠIRENJEM ANTIBIOTSKE REZISTENCIJE

Bakterija *A. baumannii* pokazuje nevjerojatnu genetičku plastičnost koja joj omogućuje akumulaciju stranih gena i stjecanje mehanizama antibiotske rezistencije. Veliku ulogu u tome ima horizontalni prijenos gena pomoću mobilnih genetičkih elemenata, koji uključuju insercijske sekvence, transpozone i integrone. Ovi elementi imaju sposobnost translokacije s jednog mjesta u genomu na drugo i uzrok su rearanžmana DNA i insercijskih mutacija, te sudjeluju u širenju rezistencije i čimbenika virulencije. Također, mogu utjecati na ekspresiju susjednih gena.

5.1. INSERCIJSKE SEKVENCE I TRANSPOZONI

Insercijske sekvence (IS) su najjednostavniji mobilni genetički elementi, veličine između 0.5 i 2 kb. Kod bakterije *A. baumannii*, insercijske sekvence *ISAbal*, *ISAbal2*, *ISAbal3*, *ISAbal4* i *IS18* povezane su s ekspresijom gena za karbapenemaze. *ISAbal* je prisutna u najvećem udjelu MDR *A. baumannii* izolata, sadrži invertne repeticije veličine 11 pb i direktne repeticije veličine 9 pb, te se radi o elementu čija transpozicija je vrlo učestala. Insercijske sekvence vrlo često mijenjaju ekspresiju susjednih gena jer nose jake promotore, koji omogućuju pojačanu ekspresiju nizvodnih gena. *ISAbal* često se nalazi uzvodno od *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-58}* i *bla_{AmpC}* u genomu bakterije *A. baumannii* (pagano i sur., 2016). *A. baumannii* je uz pomoć *ISAbal* primila gen *bla_{OXA-23}* od bakterije *A. radioresistens*. Gen *bla_{OXA-58}* je često ograđen IS elementima. Na 5' kraju, u različitim izolatima *A. baumannii*, potvrđena je prisutnost *ISAbal*, *ISAbal2* ili *IS18*, a na 3' kraju se nalazi *ISAbal3* ili *ISAbal*. Ako je ograđen s dvije kopije *ISAbal*, radi se o transpozonu Tn2006, značajnom u širenju gena za rezistenciju na karbapeneme. Međutim, smatra se da ovi elementi nisu odgovorni za preuzimanje ovog gena, već da se to odvija homolognom rekombinacijom pomoću 27 pb dugih ponavljajućih sekvenci. Nadalje, geni za β -laktamaze širokog spektra PER-1, PER-7 i VEB-1 često su asocirani s mobilnim genetičkim elementima. Gen *bla_{PER-1}* omeđen je uzvodno s *ISPal2* i nizvodno s *ISPal3*, koji zajedno čine Tn1213 transpozon. Uzvodno od gena *bla_{PER-7}* nalazi se *ISCR1*, čiji promotor je odgovoran za pojačanu ekspresiju *bla_{PER-7}*. IS elementi asocirani su i s genima metalo- β -laktamaza. Primjerice, *bla_{NDM}* se nalazi između dvije kopije *ISAbal25* i čini složeni transpozon Tn125. U ovom slučaju, ekspresija gena *bla_{NDM}* određena je

hibridnim promotorom, dio kojeg čini promotorska sekvenca IS elementa. IS*Aba125* primarno je identificiran u genomu bakterije *A. baumannii* kao nezavisni element, a ne u asocijaciji s genom, dok su u drugim bakterijama poput *Pseudomonas aeruginosa* pronađeni dijelovi ovog elementa. To je implikacija da je IS*Aba125* izvorno iz bakterije *A. baumannii*, te da bakterija *A. baumannii* nije uvijek receptor gena za rezistenciju, već i donor. Često je prisutna insercija IS*Aba1* usred gena *carO*, za porin vanjske membrane. Neprisutnost CarO doprinosi rezistenciji na karbapeneme. Gen za 16S rRNA metilazu, *armA*, dio je transpozona Tn*1548*, velikog složenog transpozona kojeg čine dvije kopije IS26.

5.2. INTEGRONI

Integroni su genetičke strukture koje se sastoje od gena za integrazu i *attI* (*attachment site integron*). Integraza može određene genske kazete uklopiti u integron mjesno-specifičnom rekombinacijom između *attC* (*attachment site cassette*) i *attI* mjesta. Jednom uklopljena, genska kazeta unutar *attI* mjesta prepisuje se s *p_c* promotora. Konačno, integron može sadržavati jednu ili više genskih kazeta za rezistenciju i kao takav je značajan vektor. Poznato je tri razreda integrona povezana s MDR fenotipom bakterije *A. baumannii*. Gen *arr-2*, koji kodira rifampicin ADP-ribozilirajuću transferazu, pronađen je kao genska kazeta unutar integrona razreda 1 i, kao takav, ima mogućnost horizontalnog prijenosa. Gen za VEB-1 β -laktamazu širokog spektra, *bla_{VEB-1}*, je genska kazeta unutar integrona razreda 1. Dio integrona razreda 1 je i *sulI* gen, čiji produkt omogućuje otpornost na sulfonamide mehanizmom efluksa. Nadalje, geni za metalo- β -laktamaze, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* i *bla_{SIM}*, dio su integrona razreda 1. Mendes i sur. su opisali integron razreda 1 In86 s genskim kazetama *bla_{IMP}*, *aac(6')-3I* i *aadA1*, s velikim potencijalom širenja (prisutan u svim kliničkim izolatima iz brazilske bolnice).

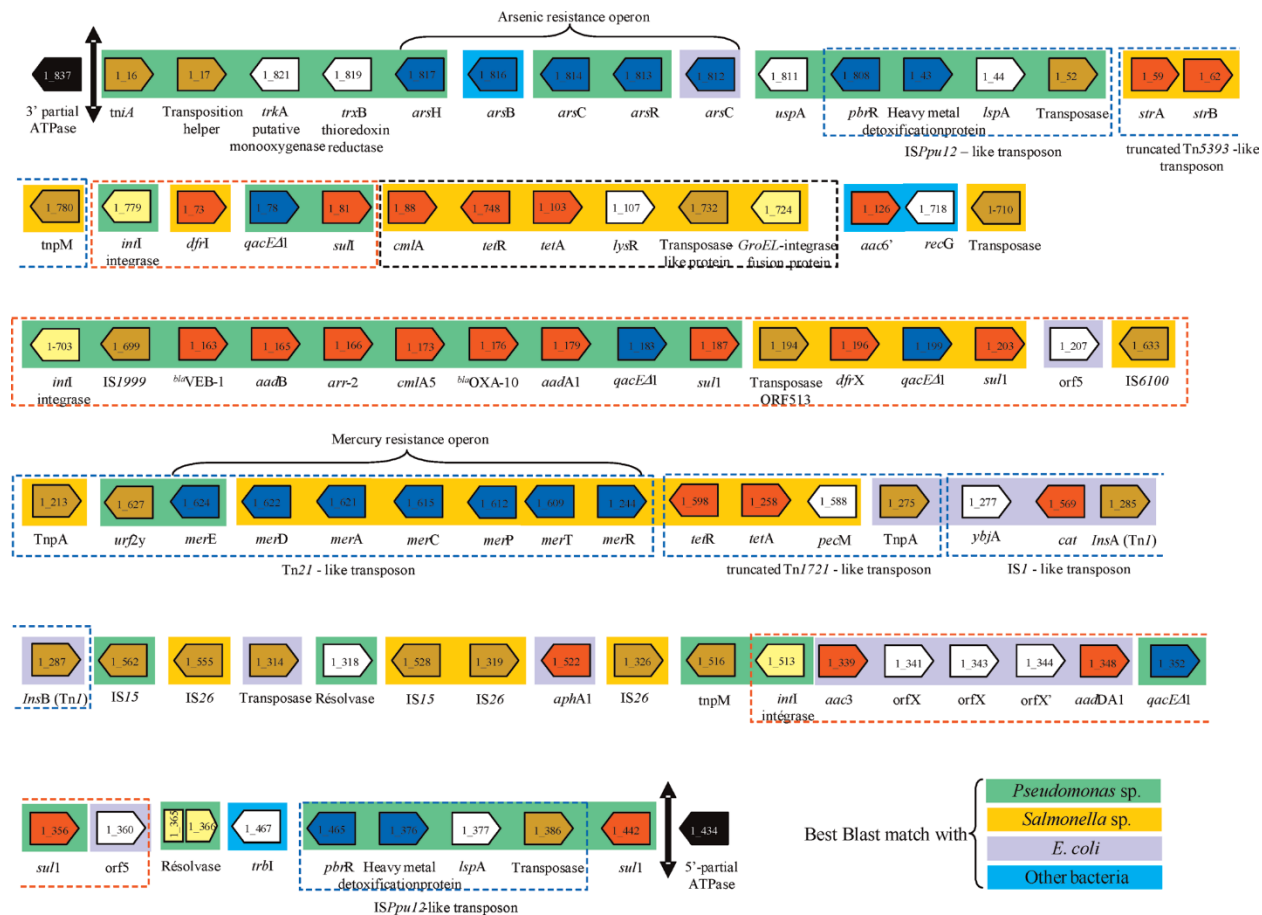
Različite vrste genskih kazeta upućuju na važnu ulogu geografskih značajki u širenju MDR fenotipa, u smislu korištenja različitih profila antibiotika u različitim geografskim područjima. Broj asociranih genskih kazeta tijekom vremena raste, te se čini da fizička asocijacija genskih kazeta unutar integrona i integrona s drugim genetičkim elementima ima selektivnu prednost.

5.3. OTOCI REZISTENCIJE

Neki MDR sojevi sadrže genomske regije koje sadrže gusto pakirane markere rezistencije, tzv. otoke rezistencije (*resistance island*; RI) integrirane u nukleoid ili na plazmidu, koji sadrže niz gena koji kodiraju proteine koji sudjeluju u inaktivaciji ili izbacivanju antibiotika iz stanice. Između ovih gena, često su raspršeni mobilni genetički elementi, koji su vjerojatno zaslužni za prijenos ove regije kod bakterije *A. baumannii*. Međutim, RI nisu prisutni kod svih MDR sojeva *A. baumannii*, dakle, nisu uvjet za fenotip MDR (Adams i sur., 2008).

U svojem radu, Fournier i sur. (2006), metodom sekvenciranja ukupnog genoma usporedili su genome *A. baumannii* sojeva SDF i AYE, s posebnim naglaskom na gene povezane s antibiotskom rezistencijom. Soj SDF izoliran je iz vrste uši (Phthiraptera) koje parazitiraju na ljudima i izrazito je osjetljiv na antibiotike, a soj AYE epidemičan je u bolnicama u Francuskoj i rezistentan je na aminoglikozide, fluorokinolone, kloramfenikol, tetraciklin, rifampin i većinu β -laktama. Osim što su otkriveni geni povezani s prethodno poznatom antibiotskom rezistencijom, rezultati su pokazali da se kod soja AYE većina tih gena nalazi agregirano. U soju AYE, 86,5% gena za koje se predviđa da su povezani s rezistencijom agregirano je u regiju veličine 86 190 parova baza, AbaR1 otok rezistencije, koja narušava ORF ATPaze, gen *comM*. Ova regija određena je kao otok rezistencije na temelju veličine, većeg udjela G+C sadržaja u usporedbi s kromosomom, prisutnosti gena za integraze, transpozaze i insercijskih sekvenci, te na temelju raznolike filogenije ORF-ova. To je najveći otok rezistencije poznat do tada. AbaR1 uključuje 22 ORF-a koji kodiraju transpozaze ili druge proteine povezane s mobilnosti genoma (Slika 4.). Obje regije na krajevima sadrže direktne repetitije ACCGC, što upućuje na mogućnost transpozicije. Na homolognom mjestu, soj SDE sadrži umetnutu genomsku regiju veličine 19 632 parova baza, što upućuje na to da je ORF ATPaze vruće mjesto za genomsku nestabilnost. Međutim, metodom PCR, koristeći konzervirane sekvence ORF ATPaze, dobiven je rezultat koji potvrđuje intaktni ORF ATPaze u 17 od 22 klinička izolata *A. baumannii*. Pet izolata s narušenim ORF ATPaze pokazuju različite obrasce antibiotske rezistencije i osjetljivosti. Dakle, prisutnost genomskog otoka unutar ORF ATPaze nije konzervirano svojstvo, te njegovu neprisutnost nije moguće odrediti iz obrasca antibiotske osjetljivosti. AbaR1 kodira ukupno 88 ORF-a. AbaR1 uključuje 22 ORF-a koji kodiraju transpozaze ili druge proteine povezane s mobilnosti genoma, što objašnjava rapidno stjecanje višestruke rezistencije. Sličnosti sekvenci aminokiselina u proteinskim

produktima, koje ovi geni kodiraju, upućuju na to da je bakterija *A. baumannii* lateralnim prijenosom primila 44% ovih genskih kazeta od *Pseudomonas* spp., 34% od *Salmonella* spp., 17% od *Escherichia* spp., te 4% od drugih mikroorganizama. Ovi bakterijski rodovi dijele bolničku okolinu s bakterijom *A. baumannii*.



Slika 4. (Preuzeto iz Fournier i sur., 2006) Shema otoka rezistencije AbaR1 insertiranog u *comM* gen *A.baumannii* soja AYE. Kategorije gena indicirane su bojama: rezistencija na antibiotike – crveno, rezistencija na teške metale i antiseptike – plavo, transpozaze – smeđe, integreaze – žuto, druge funkcije – bijelo. Geni koji pokazuju homologiju s genima iz *Pseudomonas* podcrtani su zeleno, iz *Salmonella* žuto, iz *Escherichia coli* svijetloplavo i tirkizno za druge bakterije. Crvena isprekidana linija pokazuje čitave integrone, plava transpozone, a crna genski klaster pronažen u *Salmonella* genomskom otoku 1.

Genomski otoci su vruća mjesta za integraciju, međutim mehanizam integracije je nepoznat. AbaR1 sadrži i gene koji se u drugim bakterijama nalaze na plazmidu, no nisu prisutni

plazmidni markeri. Moguće je da bakterija *A. baumannii* koristi strategiju poznatu kod bakterije *A. calcoaceticus*, koja može integrirati u kromosom gene za antibiotsku rezistenciju s R plazmida i odbaciti ostatak plazmida. Nadalje, mogući način primanja gena jest prirodna transformacija, što je potvrđeno kod *Acinetobacter* spp. Također, prirodnu transformaciju vjerojatno potpomaže bliska filogenetska veza *Acinetobacter* spp. i *Pseudomonas* spp., budući da postoje indirektni dokazi prijenosa RI između kliničkih izolata.

6. ZAKLJUČAK

Bakterija *A. baumannii* pokazuje visoku razinu genetičke plastičnosti, što joj omogućuje stjecanje i širenje gena za rezistenciju i drugih genetičkih rješenja koja su temelj rezistencije. Genomskim analizama identificiran je niz ovih genetičkih determinanti, što je prvi korak pri otkrivanju biokemijskih mehanizama otpornosti i načina na koji se oni mogu zaobići. Široki spektar rezistencijskih mehanizama bakteriji *A. baumannii* osigurava otpornost na sve klinički korištene antibiotike, zbog čega su kliničari primorani na korištenje kombinacija različitih antibiotika, najčešće vrlo štetnih za ljudski organizam, s nizom nuspojava. S obzirom da bakterija *A. baumannii* stječe rezistenciju izrazito brzo, dovodi se u pitanje isplativost proizvodnje novih antibiotika.

7. LITERATURA

- Adams, M. D., Goglin, K., Molyneaux, N., Hujer, K. M., Lavender, H., Jamison, J. J., ... Gill, S. R. (2008). Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/JB.00834-08>
- Ambler, R. P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1098/rstb.1980.0049>
- Cai, Y., Chai, D., Wang, R., Liang, B., & Bai, N. (2012). Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: Clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1093/jac/dks084>
- Chin, C. Y., Gregg, K. A., Napier, B. A., Ernst, R. K., & Weiss, D. S. (2015). A PmrB-regulated deacetylase required for lipid A modification and polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.00515-15>
- Cho, Y. J., Moon, D. C., Jin, J. S., Choi, C. H., Lee, Y. C., & Lee, J. C. (2009). Genetic basis of resistance to aminoglycosides in *Acinetobacter* spp. and spread of *armA* in *Acinetobacter baumannii* sequence group 1 in Korean hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.02.010>
- Coyne, S., Courvalin, P., & P  richon, B. (2011). Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.01388-10>
- Doi, Y., & Arakawa, Y. (2007). 16S Ribosomal RNA Methylation: Emerging Resistance Mechanism against Aminoglycosides. *Clinical Infectious Diseases*, 45(1), 88–94. <https://doi.org/10.1086/518605>

- Fang, F., Wang, S., Dang, Y. X., Wang, X., & Yu, G. Q. (2016). Molecular characterization of carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii* in China. *Genetics and Molecular Research*, 15(1). <https://doi.org/10.4238/gmr.15017432>
- Fournier, P. E., Vallenet, D., Barbe, V., Audic, S., Ogata, H., Poirel, L., ... Claverie, J. M. (2006). Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genetics*. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020007>
- Jaidane, N., Naas, T., Mansour, W., Radhia, B. Ben, Jerbi, S., Boujaafar, N., ... Bonnin, R. A. (2017). Genomic analysis of in vivo acquired resistance to colistin and rifampin in *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.10.016>
- Kong, K. F., Schneper, L., & Mathee, K. (2010). Beta-lactam antibiotics: From antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02563.x>
- Li, X.-Z., Plésiat, P., & Nikaido, H. (2015). The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-14>
- Liu, Y. H., Kuo, S. C., Lee, Y. T., Chang, I. C. Y., Yang, S. P., Chen, T. L., & Fung, C. P. (2012). Amino acid substitutions of quinolone resistance determining regions in GyrA and ParC associated with quinolone resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter genomic species 13TU*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2011.09.001>
- Marchand, I., Damier-Piolle, L., Courvalin, P., & Lambert, T. (2004). Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.9.3298-3304.2004>

- Mendes, R. E., Castanheira, M., Toleman, M. A., Sader, H. S., Jones, R. N., & Walsh, T. R. (2007). Characterization of an integron carrying blaIMF-1 and a new aminoglycoside resistance gene, aac(6')-31, and its dissemination among genetically unrelated clinical isolates in a Brazilian Hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.00838-06>
- Olaitan, A. O., Morand, S., & Rolain, J. M. (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: Acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00643>
- Pagano, M., Martins, A. F., & Barth, A. L. (2016). Mobile genetic elements related to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Brazilian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.06.005>
- Poirel, L., Bonnin, R. A., & Nordmann, P. (2011). Genetic basis of antibiotic resistance in pathogenic *Acinetobacter* species. *IUBMB Life*. <https://doi.org/10.1002/iub.532>
- Poirel, L., & Nordmann, P. (2006). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(9), 826–836. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01456.x>
- Rumbo, C., Gato, E., López, M., Ruiz De Alegría, C., Fernández-Cuenca, F., Martínez-Martínez, L., ... Tomás, M. (2013). Contribution of efflux pumps, porins, and β -lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.00730-13>
- Sugawara, E., & Nikaido, H. (2014). Properties of AdeABC and AdeIJK Efflux Systems of *Acinetobacter baumannii* Compared with Those of the AcrAB-TolC System of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(12), 7250–7257. <https://doi.org/10.1128/AAC.03728-14>

- Vila, J., Ruiz, J., Goñi, P., & De Anta, T. J. (1997). Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV parC gene of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1093/jac/39.6.757>
- Vila, J., Ruiz, J., Goni, P., Marcos, A., & De Anta, T. J. (1995). Mutation in the gyrA gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.5.1201>
- Williamson, R., Collatz, E., & Gutmann, L. (1986). Mechanisms of action of beta-lactam antibiotics and mechanisms of non-enzymatic resistance. *Presse Medicale (Paris, France; 1983)*.
- Zeng, X., & Lin, J. (2013). Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00128>
- Zhao, L., Li, H., Zhu, Z., Wakefield, M. R., Fang, Y., & Ye, Y. (2017). Genomic sequencing of a strain of *Acinetobacter baumannii* and potential mechanisms to antibiotics resistance. *Infection, Genetics and Evolution*, 50, 20–24. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.02.001>
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5
- Kalenić, S., 2013. *Pseudomonas, acinetobakteri i srodne bakterije*. Medicinska mikrobiologija. Medicinska naklada, Zagreb, pp. 222-225

www.cdc.gov

8. SAŽETAK

Bakterija *Acinetobacter baumannii* je Gram-negativni kokobacil prirodno prisutan u vodi i tlu. Prošlih nekoliko desetljeća glavni je uzrok bolničkih infekcija. Zbog sposobnosti brzog stjecanja gena za otpornost na antibiotike, pronalazak prikladnog tretmana postaje sve problematičniji. Glavni mehanizmi rezistencije kod Gram-negativnih bakterija uključuju enzimatsku inhibiciju, modifikaciju mete djelovanja antibiotika, prekomjerna ekspresija efluks sustava i mutacije porina. Navedene strategije koristi i bakterija *A. baumannii*. Ova bakterija sadrži intrinzične i stečene enzime β -laktamaze, koje inhibiraju djelovanje β -laktama hidrolizom, i aminoglikozid-modificirajuće enzime, koji modificiraju molekule aminoglikozida prijenosom funkcionalne skupine. Primjer enzima koji modificira metu djelovanja aminoglikozida su 16S rRNA metilaze. Nadalje, mutacije u specifičnim genima uzrokuju promjenu naboja površine stanice bakterije, što odbija određene antibiotike i onemogućuje im interakciju s vanjskom membranom. Prisutnost insercijskih sekvenci ili mutacija u promotoru i operatoru često uzrokuje prekomjernu ekspresiju intrinzičnih efluks sustava, koji tada doprinose rezistenciji na velik broj antibiotika. Mutacije koje uzrokuju gubitak funkcije porina doprinose stupnju antibiotske rezistencije na način da se smanjuje propusnost vanjske membrane. Genetičke strukture poput insercijskih sekvenci, integrona, transpozona i otoka rezistencije široko su rasprostranjene u genomu *A. baumannii*. Ovi mobilni genetički elementi omogućuju *A. baumannii* stjecanje i akumuliranje, te rasprostiranje čimbenika rezistencije putem horizontalnog genskog prijenosa.

9. SUMMARY

Acinetobacter baumannii is a Gram-negative coccobacillus commonly found in soil and water. It has been a major cause of nosocomial infections for the past few decades and is becoming more and more difficult to treat due to its ability to rapidly acquire resistance determinants to different types of antibiotics. Main resistance mechanisms performed by Gram-negative bacteria include enzymatic inhibition, modifications of target molecules, overexpression of efflux systems and porin mutations. *A. baumannii* has intrinsic and acquired enzymes β -lactamases, that inhibit β -lactam action by hydrolysis, and aminoglycoside-modifying enzymes, that modify the

aminoglycoside molecule by transfer of functional groups, represent enzymatic inhibition resistance strategy. Enzymes like 16S rRNA methylase has emerged in *A. baumannii* as aminoglycoside target modifying enzyme. Furthermore, mutations in specific genes result in modification of cell surface local charge, which repels certain antibiotics from interacting with the outer membrane. Intrinsically present efflux systems are contributing to resistance to wide range of antibiotics, when overexpressed due to the presence of IS elements or the mutation in promoter or operator sequences. Porin knockout mutations contribute to antimicrobial resistance in a way that it leads to reduced membrane permeability. Genetic structures such as insertion sequences, transposons, integrons and resistance islands are widely distributed throughout the genome of *A. baumannii*. Due to these mobile genetic elements, *A. baumannii* has a remarkable ability to acquire and accumulate, as well as disseminate resistance determinants by horizontal gene transfer.